

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1931

THÈSE

N°

100

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1931

PAR

Germaine DUCLAUX

Née le 2 Août 1885 à Saint-Germain-en-Laye (S.-et-O.)

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

DE

L'ACTION DES RAYONS ULTRA-VIOLETS
SUR LES ORGANISMES

Recherches sur le spectre d'absorption du Cytochrome

Président : M. le Professeur STROHL.

PARIS

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 23.

1931

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE
L'ACTION DES RAYONS ULTRA-VIOLETS
SUR LES ORGANISMES

RECHERCHES SUR LE SPECTRE D'ABSORPTION
DU CYTOCHROME

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1931

THÈSE

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLÔME D'ÉTAT)

Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1931

PAR

Germaine DUCLAUX

Née le 2 Août 1885 à Saint-Germain-en-Laye (S.-et-O.)

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

DE

L'ACTION DES RAYONS ULTRA-VIOLETS
SUR LES ORGANISMES

Recherches sur le spectre d'absorption du Cytochrome

Président : M. le Professeur STROHL.

PARIS

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 23

1931

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

LE DOYEN..... M. BALTHAZARD.

I. — PROFESSEURS

	MM.
Anatomie.....	ROUVIÈRE.
Anatomie médico-chirurgicale et chirurgie expérimentale.....	GRÉGOIRE.
Physiologie.....	BINET.
Physique médicale.....	STROHL.
Chimie médicale.....	DESGREZ.
Bactériologie.....	LEMIERRE.
Parasitologie et histoire naturelle médicale.....	BRUMPT.
Pathologie et thérapeutique générales.....	BAUDOUIN.
Pathologie médicale.....	CLERC.
Pathologie chirurgicale.....	LENNORMANT.
Anatomie pathologique.....	ROUSSY.
Histologie.....	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale.....	TIFFENEAU.
Thérapeutique.....	LOEPER.
Hygiène et médecine préventive.....	TANON.
Médecine légale.....	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie.....	MÉNÉTRIER.
Pathologie expérimentale et comparée.....	RATHERY.
Hydrologie thérapeutique et climatologie.....	Maurice VILLARET
Clinique médicale.....	CARNOT.
	BEZANÇON.
	ACHARD.
	MARCEL LABBÉ.
	LEREBoullet.
	NOBÉCOURT.
Hygiène et clinique de la première enfance.....	H. CLAUDE.
Clinique des maladies des enfants.....	GOUGEROT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale.....	GUILLAIN.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.....	TEISSIER.
Clinique des maladies du système nerveux.....	DELBET.
Clinique des maladies infectieuses.....	CUNÉO.
Clinique chirurgicale.....	LEJARS.
	GOSSET.
Clinique ophtalmologique.....	TERRIEN.
Clinique urologique.....	LEGUEU.
	COUVELAIRE.
Clinique d'accouchements.....	BRINDEAU.
	JEANNIN.
Clinique gynécologique.....	J.-L. FAURE.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie.....	OMBREDANNE.
Clinique thérapeutique médicale.....	VAQUEZ.
Clinique oto-rhino-laryngologique.....	SEBILLEAU.
Clinique thérapeutique chirurgicale.....	Pierre DUVAL.
Clinique propédeutique.....	SERGENT.
Clinique de la tuberculose.....	LÉON BERNARD.
Professeur sans chaire.....	MAUCLAIRE.



II. — AGREGES EN EXERCICE

MM.

ABRAMI Pathologie médicale.
 ALAJOUANINE . . . Neurologie et psychiâtr.
 AUBERTIN. Pathologie médicale.
 BASSET Pathologie chirurgicale.
 BAUDOUIN. Pathologie médicale.
 BROCC Pathologie chirurgicale.
 BRULÉ Pathologie médicale.
 CADENAT. Pathologie chirurgicale.
 CHABROL. Pathologie médicale.
 CHIRAY Pathologie médicale.
 DEBRÉ. Hygiène.
 DOGNON. Physique.
 DONZELOT. Pathologie médicale.
 DUVOIR Médecine légale.
 ECALLE Obstétrique.
 FIESSINGER Pathologie médicale.
 GARNIER. Pathologie expériment.
 GATELLIER Pathologie chirurgicale.
 GIROUD. Histologie.
 HARVIER Pathologie médicale.
 HEITZ-BOYER . . . Urologie.
 HOVELACQUE . . . Anatomie.
 HUTINEL. Pathologie médicale.
 JOYEUX. Parasitologie.
 LABBÉ (Henri). Chimie biologique.

MM.

LARDENNOIS. . . Pathologie chirurgicale.
 LEMAITRE. Oto-rhino-laryngologie.
 LEROUX. Anatomie pathologique.
 LÉVY-SOLAL. . . . Obstétrique.
 LHERMITTE . . . Pathologie mentale.
 LIAN. Pathologie médicale.
 MATHIEU Pathologie chirurgicale.
 MERCIER (F.). . . Pharmacologie.
 METZGER. Obstétrique.
 MONDOR. Pathologie chirurgicale.
 MOURE. Pathologie chirurgicale.
 MULON. Histologie.
 OBERLING. Anatomie pathologique.
 OLIVIER. Anatomie.
 PHILIBERT. . . . Bactériologie.
 QUÉNU. Pathologie chirurgicale.
 RICHET Fils. . . . Physiologie.
 SÉZARY. Dermatologie et syphili-
 VALLERY-RADOT graphie.
 (Pasteur) Pathologie médicale.
 VERNE. Histologie.
 VELTER. Ophtalmologie.
 VAUDESCAL . . . Obstétrique.

III. — AGREGES RAPPELES A L'EXERCICE

pour le service des examens

MM.

BUSQUET. Pharmacologie.
 GUENIOT. Obstétrique.
 LEQUEUX. Obstétrique.

MM.

NEVEU-LEMAIRE Parasitologie.
 RETTERER. Histologie.
 ZIMMERN. Physique

IV. — AGREGES CHARGES DE COURS

DE CLINIQUE ANNEXE

à titre permanent

MM.		MM.	
ALGLAVE.	Clinique chirurgicale.	LÉRI.	Clinique médicale.
AUVRAY.	Clinique chirurgicale	MOCQUOT.	Clinique chirurgicale.
CHEVASSU	Clinique chirurgicale.	PROUST.	Clinique chirurgicale.
LAIGNEL-LAVASTINE	Clinique médicale.	SCHWARTZ.	Clinique chirurgicale.
LE LORIER.	Clinique obstétricale.		

V. — CHARGES DE COURS

MM.	
MAUCLAIRE, Profes- seur sans chaire. .	{ Chargé du cours de chirurgie orthopédique chez l'adulte pour les accidentés du travail, les mutilés de guerre et les infirmes adultes.
FREY.....	Stomatologie.
CHAILLEY-BERT.....	Education physique.
LEDoux-LEBARD.....	Radiologie clinique.
WEILL-HALLÉ.....	Puériculture.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

Contribution à l'Etude de l'Action des Rayons Ultra-Violet sur les Organismes

INTRODUCTION

L'étude de l'action des rayons visibles et ultra-violet sur les organismes occupe une place très importante dans les recherches contemporaines. Le mécanisme de ces actions reste, cependant, le plus souvent inconnu. On admet généralement l'existence d'une suite plus ou moins complexe de réactions chimiques, dont la première seule est, à proprement parler, photo-chimique, c'est-à-dire produite par le rayonnement. Mais, en fait, ces réactions restent presque toujours hypothétiques, et il n'en existe pas encore une que l'on puisse représenter par une équation. La difficulté réside, si l'on excepte le cas de l'assimilation chlorophyllienne, dans la petitesse des masses mises en jeu, petitesse qui rend leur isolement à peu près impossible. C'est pourquoi on a eu le plus souvent recours, dans ces études, à une méthode indirecte dont le principe est le suivant :

On admet que les phénomènes photochimiques élémentaires obéissent à la loi d'Einstein. D'après cette loi la vitesse de ces réactions est mesurée par le nombre de quanta absorbés, c'est-à-dire le quotient de la puissance absorbée P_a par le produit $h\nu$, ν étant la fréquence du rayonnement et h la constante de Planck ($6,55 \cdot 10^{-27}$ ergs-sec.). On peut donc, si l'on a étudié la vitesse d'une réaction photochimique en fonction de la fréquence du rayonnement en déduire le nombre de quanta absorbés $\frac{P_a}{h\nu}$, d'où la puissance P_a et si l'on connaît la puissance incidente, P , de ce rayonnement, obtenir pour chaque

longueur d'onde le pouvoir absorbant $\hat{a} = \frac{P_a}{P}$, tout au moins en valeurs relatives, car la loi d'Einstein ne s'applique généralement pas de façon simple : par exemple l'absorption d'un quantum entraîne la réaction d'un grand nombre de molécules. On peut donc ainsi obtenir indirectement le spectre d'absorption de la substance photosensible.

Or l'absorption d'une substance est en relation assez étroite avec sa constitution chimique pour que l'on puisse tirer de la connaissance du coefficient d'absorption des renseignements sur la nature chimique des corps intéressés dans la réaction photochimique. C'est par cette méthode que Warburg a pu décrire le spectre d'absorption du ferment respiratoire des cellules de levure en étudiant, en fonction de la longueur d'onde, la décomposition photochimique du complexe formé par l'oxyde de carbone avec ce catalyseur.

La méthode trouve en elle-même sa limitation. Elle ne nous renseigne en effet que sur la substance absorbante, même si celle-ci ne joue qu'un rôle de sensibilisateur et n'entre pas dans la réaction proprement dite. Il en résulte que l'on ne connaît, en réalité, presque aucune réaction photobiologique. Même la transformation de l'ergostérol en vitamine D, dont l'étude est la plus avancée, reste encore indéterminée au point de vue chimique ; on suppose qu'il s'agit d'une oxydation, mais la constitution de la vitamine n'est pas établie. On sait que la lumière produit des coagulations du protoplasme et modifie son affinité pour les colorants, mais les réactions mises en jeu sont encore inconnues. Enfin, dans la rétine, on sait que la lumière agit sur le pourpre rétinien, mais, malgré de nombreux travaux relatifs à cette question, on ne sait pas en quoi consiste sa décomposition, d'ailleurs réversible. Toutes les théories sur le phototropisme font appel également à l'existence d'une réaction photochimique, mais la substance photosensible reste imprécisée.

En ce qui concerne l'action de la lumière solaire et des

rayons ultra-violetes sur les organismes, quelle que soit la réaction qui entre en jeu, on est tenté d'admettre qu'elle doit être sensible ou sensibilisée pour des radiations d'assez grande longueur d'onde ; l'intensité du spectre solaire s'affaiblit, en effet brusquement au voisinage de 3.000 UA et s'annule avant 2.900 ; quant au rayonnement des sources artificielles, telles que l'arc au mercure en tube de quartz, il est si rapidement absorbé par la couche cornée de la peau au delà de 2.500 UA que son action pour ces longueurs d'onde n'est sensible que sur des infusoires ou des microbes, et que, au voisinage de 2.800 UA, il a surtout une action superficielle.

Il est donc tout à fait important d'étudier les substances, présentes dans les organismes supérieurs, qui sont susceptibles de jouer un rôle de sensibilisateur dans des réactions fondamentales comme les oxydations du métabolisme et dont le spectre d'absorption possède une bande dans l'ultra-violet très long.

Le cytochrome, découvert par D. KEILIN, se présente comme l'un des corps les plus intéressants à étudier à ce point de vue. KEILIN a, en effet, montré que cette substance joue un rôle fondamental dans le métabolisme ; et l'objet de ce travail a été de rechercher, comme première étude de son intervention possible dans les actions de la lumière sur les organismes, si le cytochrome possède, comme on devait s'y attendre d'après ce que l'on sait de sa constitution, une absorption sélective à la limite du violet et de l'ultra-violet.

Je dois toute ma reconnaissance à M. le Professeur AUBEL et à M. René WURMSER, directeur du laboratoire de biophysique de l'Ecole des Hautes Etudes, ainsi qu'à Mlle Nélícia MAYER, dont l'aide m'a été si précieuse au cours de ce travail, et j'exprime ma gratitude à M. le Professeur STROHL qui a bien voulu accepter la présidence de cette thèse.

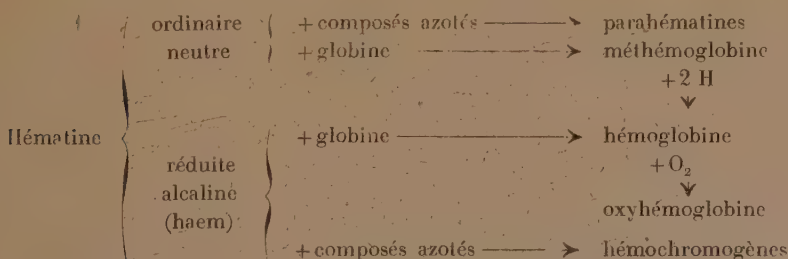
CHAPITRE PREMIER

LE CYTOCHROME

Sa caractérisation, sa répartition et son rôle physiologique.

I. *Les hématines.* — On sait que le chromoprotéide du sang, l'oxyhémoglobine, est formé d'une protéine, la globine, et d'un complexe renfermant du fer qu'on appelle l'hématine, et qui constitue le groupement prosthétique de l'oxyhémoglobine. Cette hématine, sous sa forme ordinaire, peut se recombiner avec la globine naturelle en donnant de la méthémoglobine : la méthémoglobine réduite donne l'hémoglobine qui, par oxygénation, redevient l'oxyhémoglobine. L'hématine réduite, alcaline à pH 9, à laquelle ANSON et MIRSKY ont donné le nom de « haem » donne directement l'hémoglobine quand elle est mise en contact avec la globine. L'hématine ordinaire neutre, quand elle se combine à d'autres substances azotées que la globine naturelle, donne les parahématines, tandis que l'hématine réduite alcaline donne, avec ces mêmes substances azotées, les hémochromogènes.

Le schéma ci-dessous résume ces rapports :



Cette hématine se compose d'un groupement tétrapyrrolique, appelé protoporphyrine, et de fer. Par combinaison avec l'acide chlorhydrique, la protoporphyrine donne l'hémine dont on connaît assez exactement la constitution. Mais, en dehors de la protoporphyrine, d'autres groupements tétrapyrroliques se combinent au fer pour donner des hémamines diverses qui, associées, à leur tour, à la globine naturelle, aboutissent à des pigments analogues aux hémoglobines.

II. *Le cytochrome.* — C'est, comme l'a montré KEILIN, à un mélange d'hémochromogènes qu'il faut assimiler le pigment auquel il a donné le nom de cytochrome.

En 1884-1886, Mac MUNN avait déjà découvert ce pigment sous le nom de myohématine et de histohématine ; mais son existence avait été niée dans la suite par LÉVY et HOPPE-SEYLER, puis il avait été identifié avec l'hémoglobine musculaire par GÜNTHER, si bien que l'on doit à KEILIN non seulement de l'avoir retrouvé et d'en avoir montré la répartition quasi universelle, mais encore d'avoir établi qu'il n'est pas une hématine, et enfin d'avoir étudié son rôle physiologique.

La mise en évidence du cytochrome se fait par ses propriétés spectrales à l'état réduit. Quand on place sur la platine d'un microspectroscope un verre de montre renfermant une émulsion de cellules de levure, par exemple, on n'observe guère de bandes d'absorption ; mais, si l'on ajoute à la préparation une petite quantité d'hydrosulfite de sodium, on voit apparaître deux fortes bandes dans la région verte du spectre, l'une à 565 $m\mu$ environ et l'autre à 549 $m\mu$. Le même aspect, avec un léger déplacement de ces bandes, est obtenu avec des tissus musculaires de quelques dixièmes de millimètres d'épaisseur. Il existe, en outre, deux autres bandes, l'une dans la région rouge vers 600 $m\mu$, l'autre, d'aspect cannelé, c'est-à-dire présentant des renforcements, dans le vert extrême, à 520 $m\mu$ environ. KEILIN a donné à ces diverses bandes les désignations suivantes, les longueurs d'onde étant exprimées en UA (unités Angstrom).

	BANDE <i>a</i>	BANDE <i>b</i>	BANDE <i>c</i>	BANDE <i>d</i>
Bacillus subtilis	6.032	5.660	5.502	5.210
Levures.	6.035	5.645	5.490	5.140
Echalote	6.035	5.640	5.500	5.190
Abeille	6.046	5.665	5.502	5.210
Dytique.	6.038	5.664	5.495	5.205
Galleria	6.046	5.657	5.495	5.200
Escargot.	6.035	5.650	5.495	5.200
Grenouille	6.040	5.660	5.500	5.205
Cobaye	6.045	5.662	5.500	5.205

III. *Complexité du cytochrome.* — Le spectre du cytochrome oxydé diffère profondément de celui du cytochrome réduit. Il ne possède plus que deux bandes diffuses, l'une aux environs de 566 $m\mu$, l'autre dont l'axe correspond à 529 $m\mu$ environ. On peut donc suivre facilement par l'observation spectroscopique l'oxydation ou la réduction du cytochrome. Or on constate, au cours de la réduction, quand on opère sur des cellules de levure préalablement traitées par l'uréthane ou l'alcool, que la bande *c* disparaît très rapidement et que cette disparition est suivie par celle de la bande *a*, tandis que la bande *b* et une partie de *d* restent distinctement visibles pendant un certain temps. Tout se passe donc comme si ces diverses bandes appartaient à des corps différents.

En outre, les intensités relatives de ces bandes varient d'un organisme ou d'une catégorie de cellules à l'autre.

Enfin, on peut extraire par l'eau un pigment qui ne contient que la bande *c* et une partie de la bande *d*.

KEILIN a interprété ces faits en admettant que le cytochrome n'est pas constitué par une seule substance chimique, mais qu'il représente un mélange de trois substances indépendantes (*a'*, *b'* et *c'*). Chacune de ces substances ressemble spectroscopiquement à un hémochromogène montrant deux bandes d'absorption (α et β) à l'état réduit (la bande α étant la plus forte), et un spectre d'absorption faible à l'état oxydé.

Les bandes *a*, *b* et *c* du cytochrome correspondraient donc

aux bandes α de ces trois composés, tandis que les renforcements x , y , et probablement z de la bande d du cytochrome correspondraient à leurs bandes β (fig. 1).

	a	b	c	d $z \quad y \quad x$		
Cytochrome	d_1	d_2	d_3	β_1	β_2	β_3
Composé α'	d_1			β_1		
„ b'		d_2			β_2	
„ c'			d_3			β_3

FIG. 1.

IV. *Origine du cytochrome.* — La porphyrine que l'on obtient en traitant le cytochrome c' par les acides bromhydrique et acétique ne peut pas être distinguée de l'hématoporphyrine que l'on obtient en traitant de la même façon l'hématine ordinaire. Ces deux porphyrines peuvent être aisément transformées en protoporphyrine. Ces faits, mis en évidence par R. HILL et D. KEILIN, apportent une confirmation à l'hypothèse, avancée par ce dernier auteur que le cytochrome dérive de la protohématine présente dans les cellules.

Cette origine du cytochrome est basée en outre sur les observations suivantes :

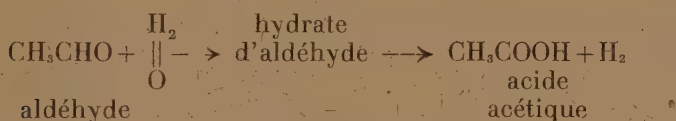
1° Que les cellules des organismes aérobies contiennent, en plus du cytochrome, ou même en l'absence de ce pigment, de la protohématine.

2° Que la protohématine et les hémochromogènes correspondants cèdent progressivement leur place au cytochrome au cours du développement d'un même organisme.

3° Que le protohémochromogène ordinaire (de la pyridine, de la nicotine, etc.) peut être transformé par oxydation et réduction successive en substances dont le spectre d'absorption est semblable à celui du cytochrome.

V. *Rôle physiologique du cytochrome.* — Pour comprendre le rôle attribué par KEILIN au cytochrome, il faut rappeler brièvement la conception que l'on se fait actuellement du mécanisme des oxydations dans les organismes. On admet que les corps sur lesquels porte le métabolisme, les métabolites, pour employer l'expression de THUNBERG, s'oxydent non par simple fixation d'oxygène, mais par déshydrogénation préalable. C'est ainsi que WIELAND a observé la formation d'acide acétique à partir de l'aldéhyde, en présence de palladium et d'eau ; le palladium se charge d'hydrogène ; l'accepteur de cet hydrogène est indifférent : palladium, benzoquinone, bleu de méthylène ou oxygène.

WIELAND admet que l'eau s'est d'abord liée à l'aldéhyde acétique en formant un hydrate, préalablement à l'oxydation. En effet, si l'on opère en l'absence d'eau, la réaction n'a pas lieu. On admet donc le schéma suivant :



La théorie de WIELAND a reçu de nombreuses confirmations dans le domaine des réactions biologiques. On appelle déshydrases les diastases qui catalysent cette mobilisation préalable de l'hydrogène.

Mais il semble que cet hydrogène n'est pas toujours capable de se combiner sans autre catalyseur à l'oxygène moléculaire. Les métabolites sont donc soumis à l'action de deux types de catalyseurs : les déshydrases et les oxydases. Les premières agissent en mobilisant l'hydrogène et les autres en accélérant la fixation de l'oxygène moléculaire. Entre ces deux systèmes il y aurait des transporteurs d'hydrogène se réduisant au contact des déshydrases et s'oxydant en présence des oxydases. Selon KEILIN, le cytochrome fonctionnerait comme transporteur.

En effet, tandis que dans les cellules fraîches de levure, par exemple, le cytochrome s'oxyde facilement, on constate qu'il en est tout autrement avec la levure bien desséchée ou traitée par l'acétone, et mise en suspension dans une solution de phosphates de pH 7,3. Si l'on fait passer de l'air à travers cette suspension, on voit que l'oxydation des composés *a'*, et surtout *c'*, est très incomplète. Le cyanure de potassium, qui est un poison des oxydases, arrête complètement l'oxydation du pigment. Au contraire, par lavage à l'eau, l'oxydation devient plus forte.

Cette différence entre le comportement du cytochrome de la levure vivante et de la levure desséchée, l'oxydation lente et seulement partielle des composés *a'* et *c'* du cytochrome dans la levure desséchée ; enfin l'inhibition par le cyanure de potassium, s'expliquent si l'on admet que l'oxydation et la réduction des composés *a'* et *c'* sont liées : 1° au système composé de substances ou ferments réducteurs ; 2° au système mobilisant l'oxygène. Le cyanure inhibe en effet complètement le système oxydasique, et, dans la levure desséchée, ce système est moins actif que dans la levure fraîche. Au contraire, le lavage à l'eau élimine les corps réducteurs et facilite par conséquent l'oxydation.

Cette conception n'est pas admise par SHIBATA et TAMIYA qui pensent que le cytochrome est un emmagasineur d'oxygène moléculaire. Mais les plus récents travaux de KEILIN confirment sa théorie du rôle de transporteur d'hydrogène du cytochrome.

CHAPITRE II

RECHERCHES SUR LES PROPRIETES SPECTRALES DU CYTOCHROME

VI. *Le spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine.* — Nous venons de voir que le cytochrome est un mélange d'hémochromogènes, c'est-à-dire de composés constitués par un groupement prosthétique, l'hématine, associé à des composés azotés.

Cette analogie avec les pigments sanguins permet de prévoir que l'on doit trouver, dans la région violette extrême du spectre, une bande d'absorption sélective du cytochrome analogue à celle que possède, dans cette région, l'oxyhémoglobine.

Le spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine présente, en effet, dans les courtes longueurs d'ondes, deux bandes principales d'absorption : l'une située à $4.144 \text{ U } \text{\AA}$, l'autre à $2.788 \text{ U } \text{\AA}$, d'après Victor HENRI et WURMSER, et, à 4.160 et 2.750 , d'après VLÈS.

On sait, depuis DHÉRÉ, que la bande située à $2.750 \text{ U } \text{\AA}$ correspond au radical protéique, tandis que la bande située à $4.160 \text{ U } \text{\AA}$ correspond au groupement prosthétique.

On devait donc s'attendre à trouver dans le spectre du cytochrome une bande d'absorption aux environs de $4.160 \text{ U } \text{\AA}$. C'est ce que j'ai pu mettre en évidence.

VII. *Préparation des extraits de Cytochrome.* — Mon étude a porté sur une solution de cytochrome *c'* préparée selon la méthode indiquée par KEILIN. Ce composé peut être extrait à partir de la levure.

1° *Extraction du cytochrome *c'* de la levure.* — Un kilo-

gramme de levure de boulangerie fraîche est plasmolysé par mélange avec 50 grammes de chlorure de sodium pur, et est rapidement versé dans 3 litres d'eau bouillante. On opère dans une grande bassine émaillée de 12 litres environ. Le mélange est agité pendant 5 minutes jusqu'à ce que la température atteigne au moins 90° C. On refroidit ensuite rapidement en ajoutant 5 kilogrammes de glace pilée.

On laisse la suspension déposer pendant 3 à 4 heures et le liquide surnageant est siphonné. La fine suspension de levure qui reste au fond est versée dans un grand entonnoir de Buchner sur une double couche de papier filtre et une couche de Kieselguhr. Le liquide est aspiré par une trompe à vide, et le gâteau de levure restant dans l'entonnoir est lavé avec une centaine de centimètres cubes d'eau distillée.

On détache le gâteau de levure (environ 400 grammes) et on le mélange avec 240 cc d'eau distillée et 24 gr. de bisulfite de sodium. Le mélange est agité de manière à obtenir une suspension fine que l'on verse dans une bouteille fermée par un bouchon de verre. On ajoute 24 grammes d'hydrosulfite de sodium finement broyé et l'on agite vivement, puis on abandonne la préparation pendant une demi-journée.

On verse ensuite le contenu de la bouteille dans un grand entonnoir de Buchner sur deux couches de papier filtre et une couche de kieselguhr. On aspire à la trompe. On obtient alors un liquide clair, de couleur rose, qui contient le cytochrome réduit et montre à l'examen spectroscopique les bandes caractéristiques. On lave la masse restée sur l'entonnoir avec de l'eau distillée jusqu'à ce qu'elle n'abandonne plus de pigment.

La solution ainsi obtenue contient, en plus du cytochrome *c'*, des protéines et des sels.

2° Purification de l'extrait de cytochrome. — On agite vivement à l'air le liquide obtenu précédemment et l'on y ajoute 0,7 % de chlorure de calcium ; puis on fait passer un fort courant d'anhydride sulfureux à travers la solution. Il se dépose alors un lourd précipité de protéines mélangé au cyto-

chrome *c'*. Une portion du cytochrome, qui est encore réduit, reste dans la solution, mais en agitant la préparation à l'air, le pigment s'oxyde et précipite avec le reste de protéine.

On lave le précipité par siphonage ou par centrifugation. Le lavage est répété plusieurs fois jusqu'à disparition de toute trace de sels ou de SO_2 . Le précipité, qui est de couleur gris brun, est mis en suspension dans l'eau et neutralisé avec de la soude. Cette solution est ensuite reprécipitée par l'anhydride sulfureux ; puis on lave et on redissout à nouveau. On a ainsi une solution de cytochrome *c'* presque entièrement oxydée ; mais cette solution contient encore beaucoup de protéines, et l'on obtient une préparation plus pure en opérant de la manière suivante également indiquée par Keilin.

L'extrait de cytochrome réduit additionné de chlorure de calcium, au lieu d'être oxydé est maintenant réduit pendant que l'on fait passer lentement un courant de SO_2 . Dès que les protéines commencent à se rassembler et à tomber, on arrête le courant de SO_2 . Le précipité blanc de protéines, qui est à peu près exempt de pigment, est séparé du liquide par filtration à travers une couche de kieselguhr. Le liquide rose est alors oxydé par agitation, et, après addition d'une faible quantité de chlorure de calcium, on fait de nouveau passer le courant de SO_2 . Le liquide se trouble et il se dépose un précipité brun composé de cytochrome et d'une fraction de protéines. Ce précipité est lavé soigneusement à l'eau distillée ; il est faiblement soluble à pH 6-9 en donnant une forte solution de cytochrome *c'*.

VIII. *Recherches qualitatives sur l'absorption du cytochrome.*

— Les mesures optiques au spectrophotomètre ne peuvent être effectuées au-dessous de $\lambda = 450 \text{ m}\mu$. J'ai donc eu recours à la spectrographie. La méthode employée consiste à photographier successivement sur une même plaque une série de spectres alternativement à travers une épaisseur donnée du solvant et à travers une même épaisseur de la solution dont on veut étudier le spectre d'absorption. Dans ces conditions,

les bandes spectrales apparaissent en clair sur les clichés et coupées transversalement par les spectres photographiés à travers le solvant.

Cette manière d'opérer élimine les bandes apparentes qui pourraient provenir d'une discontinuité dans la répartition de l'intensité du spectre de la source employée. Elle permet en outre d'obtenir, le cas échéant, des déterminations quantitatives du coefficient d'absorption.

La source employée est le tube à hydrogène de Challonge

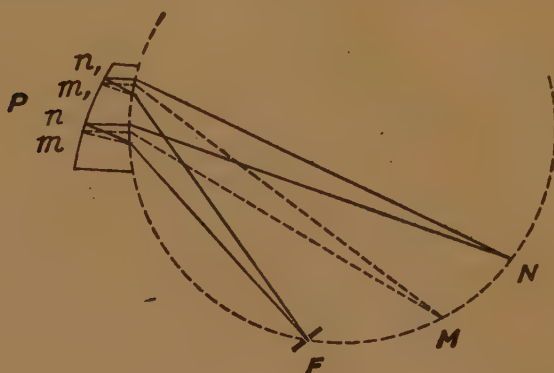


FIG. 2.

avec fenêtre en quartz, fonctionnant sous une tension de 3.000 volts et 100 milliampères. Le spectre fourni par ce tube est continu dans l'ultra-violet ; dans la région qui nous intéresse, il présente un certain nombre de raies qui facilitent d'ailleurs le repérage, que l'on réalise en photographiant un spectre de mercure et de fer.

Le spectrographe employé est un spectrographe de Féry, à prisme de quartz, et sans lentille. Les rayons issus de la fente F sont réfractés par le prisme dont la face postérieure est rendue réfléchissante et renvoie les rayons qui viennent, suivant leur dispersion, former un foyer entre M et N où le châssis renfermant la plaque est situé. Ce châssis porte un gabarit cylindrique, du rayon de courbure de la surface focale, sur

lequel la plaque vient se cintrer. Il peut être déplacé verticalement par l'intermédiaire d'un piston commandé par un bouton moleté ; on peut ainsi effectuer sur une même plaque 11 spectres-successifs.

Les plaques utilisées étaient des plaques orthochromatiques 35×240 , très minces de manière à ce qu'on puisse les cintrer sans les briser.

Un premier cliché a été obtenu en photographiant successivement à travers une cuve à faces de quartz de 2 cm. d'épaisseur :

1°	pendant	10	secondes	la solution de cytochrome.
2°	—	10	—	l'eau distillée.
3°	—	30	—	la solution.
4°	—	10	—	l'eau.
5°	—	60	—	la solution.
6°	—	10	—	l'eau.
7°	—	120	—	la solution.
8°	—	10	—	l'eau.
9°	—	180	—	la solution.
10°	—	10	—	l'eau.
11°	—	240	—	la solution.

En opérant de la même manière avec une cuve de 1 mm. d'épaisseur et avec une cuve de 0,1 mm., on observe une absorption croissante dans l'ultra-violet extrême.

Le premier cliché montre nettement une bande d'absorption située entre 4.000 UÅ et 4.250 UÅ avec un maximum aux environs de 4.150 UÅ.

Je n'ai pas trouvé de bande d'absorption au voisinage de 2.450 UÅ, l'absorption augmentant seulement de façon continue. En réalité, il faudrait, pour étudier le spectre d'absorption ultra-violet, opérer sur des solutions de cytochrome pur. Les résultats dont il y a lieu de tenir compte sont donc seulement ceux relatifs à la bande 4.150 UÅ.

Cette bande à l'existence de laquelle on pouvait s'attendre existe donc bien dans le spectre d'absorption du cytochrome

et a très sensiblement la même position que la bande γ de l'oxyhémoglobine.

IX. Détermination quantitative de l'absorption.

1° Mesures spectrophotométriques. — Soit I_0 l'intensité d'un rayonnement qui tombe sur une couche absorbante, et I_1 l'intensité du rayonnement transmis, le coefficient de transmission est :

$$\frac{I_1}{I_0}$$

Et l'opacité est :

$$\frac{I_0}{I_1}$$

Enfin, la densité, δ , est définie comme le logarithme de l'opacité. On a, d'autre part, si l est l'épaisseur de la couche absorbante

$$I_1 = I_0 10^{-Kl}$$

K étant le coefficient d'absorption.

On en déduit :

$$K = \frac{\delta}{l}$$

Le spectrophotomètre dont je me suis servi est celui de Jobin et Yvon. Il consiste essentiellement en un cube de Lummer et Brodhum à trois plages. Les deux plages externes sont éclairées par la lumière traversant la couche absorbante ; la plage centrale est éclairée par un faisceau issu de la même source qui traverse un système de nicols.

Les deux faisceaux sont dispersés par un prisme monté sur un plateau mobile que l'on tourne de manière à amener successivement les diverses régions spectrales entre les lèvres d'un volet au-devant duquel se trouve le viseur de plages.

On établit pour chacune des régions spectrales l'égalité entre les plages en faisant tourner l'un des nicols. Si θ est l'angle

des sections principales des deux nicols à partir de leur position d'extinction complète, la densité du système de nicols est égale à $2 \operatorname{colog} \sin \theta$.

La cuve absorbante avait 1 cm. d'épaisseur ; on peut donc dans ce cas, écrire.

$$K = \varepsilon$$

Quand la cuve était remplie avec de l'eau distillée, la rotation θ_0 était de $15^{\circ}15'$; on a donc

$$\varepsilon_0 = 1,165$$

Le tableau suivant donne les valeurs de θ pour les diverses longueurs d'onde, quand la cuve contenait la solution de cytochrome, et les valeurs de K calculées par différence.

$$K = \varepsilon = 2 \operatorname{colog} \sin \theta - 1,165$$

λ	θ	K
660	$10^{\circ} 0'$	0,35
650	$10^{\circ} 0'$	0,35
640	$10^{\circ} 0'$	0,35
630	$10^{\circ} 0'$	0,35
620	$10^{\circ}10'$	0,34
610	$10^{\circ}30'$	0,32
600	$10^{\circ}30'$	0,32
590	$10^{\circ}10'$	0,34
580	$9^{\circ}45'$	0,37
570	$9^{\circ}40'$	0,38
560	$9^{\circ}11'$	0,43
555	$8^{\circ}30'$	0,49
550	$7^{\circ} 0'$	0,66
545	$8^{\circ} 8'$	0,54
540	$8^{\circ}10'$	0,53
535	$8^{\circ}47'$	0,46
530	$8^{\circ}20'$	0,50
525	$8^{\circ} 0'$	0,55
520	$7^{\circ}30'$	0,60
515	$7^{\circ}53'$	0,56
510	$7^{\circ}42'$	0,58
505	$8^{\circ} 0'$	0,55
500	$8^{\circ}12'$	0,53
495	$8^{\circ} 0'$	0,55

2° *Mesures spectrographiques.* — Les déterminations spectrophotométriques devenant peu exactes dans la région violette du spectre, et la bande d'absorption qui nous intéresse étant d'ailleurs située en partie dans l'ultra-violet, les déterminations du coefficient d'absorption dans cette région spectrale ont été effectuées par la méthode spectrographique. J'ai déjà indiqué que cette méthode pouvait en effet être rendue quantitative.

Le principe de la méthode employée (Victor HENRI et WURMSER) consiste à photographier un spectre, à des durées de poses variables, d'une part à travers le solvant, d'autre part à travers la solution absorbante à étudier. On cherche les temps de pose nécessaires pour obtenir une même intensité de noircissement de l'image d'une raie faite à travers le solvant et de celle obtenue à travers la solution à étudier.

Le noircissement S est une certaine fonction de l'intensité incidente I du rayonnement auquel la plaque a été soumise pendant l'exposition et de la durée t de cette exposition. Schwarzschild a donné la loi du noircissement :

$$S = \varphi(I t^n) = \log I k t^n;$$

n est un coefficient qui varie avec la plaque employée, et est voisin de 0,9.

Soit S_1 , S_2 , deux noircissements produits respectivement par des intensités I_1 , I_2 , agissant pendant des temps t_1 , t_2 . On a, dans le cas où les deux noircissements sont égaux :

$$S_1 = S_2$$

$$\frac{I_1 t_1^n}{I_2 t_2^n} = 1$$

D'où

$$K = \frac{0,9}{I} \log \frac{t_1}{t_2}$$

I_2 étant l'intensité après passage de la radiation dans la solution, et I_1 , son intensité après passage dans le solvant. Le

tableau suivant indique, pour un certain nombre de longueurs d'onde, les rapports $\frac{t_2}{t_1}$, obtenus par une épaisseur $l = 1$ cm., et les valeurs de K que l'on en déduit.

λ	t_2/t_1	K
4.300	6	0,62
4.250	12	0,96
4.220	18	1,12
4.200	30	1,32
4.100	> 30	> 1,32
4.050	30	1,32
4.000	18	1,12
3.900	12	0,96
3.800	18	1,12
3.750	30	1,32

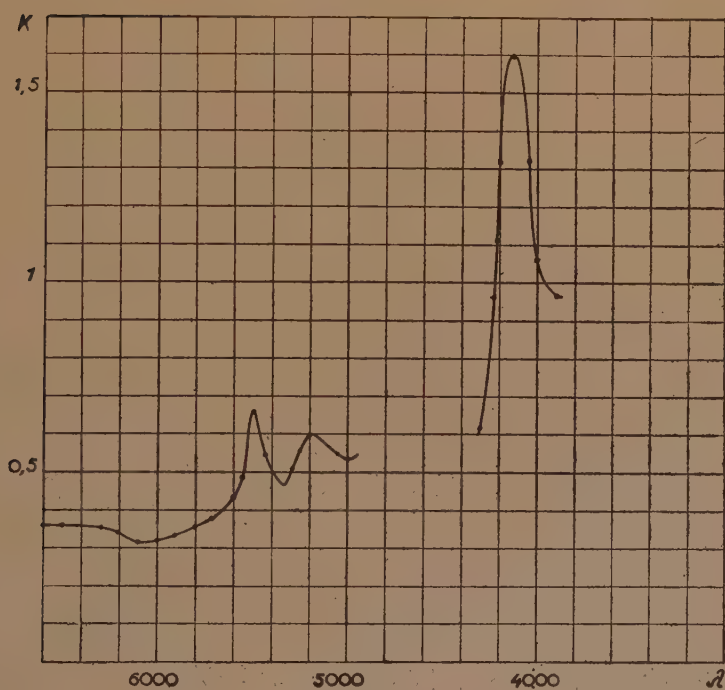


FIG. 3.

En opérant avec une épaisseur de 2 mm., 5 on trouve que le rapport $\frac{t_2}{l_1}$ correspondant à l'égalité de teinte du spectre photographié à travers le solvant et à travers la solution est égal à 3 pour $\lambda = 4.150$.

On a donc, pour cette longueur d'onde qui marque le maximum de la bande d'absorption :

$$K = \frac{0,9}{0,025} \log 3 = 1,7$$

La figure 3 représente finalement tous les résultats obtenus : elle donne le spectre d'absorption d'une solution de cytochrome *c'* dans les régions spectrales étudiées.

CONCLUSIONS

Au cours de ce travail, j'ai pu mettre en évidence l'existence d'une bande d'absorption du cytochrome située à la limite du spectre visible et du spectre ultra-violet, et dont la position est identique à celle de l'oxyhémoglobine.

Le cytochrome, qui possède cette bande d'absorption dans la région violette extrême du spectre, est susceptible de jouer un rôle dans les actions de la lumière sur les organismes.

Puisque le cytochrome paraît intervenir, au cours des oxydations cellulaires comme transportant l'hydrogène des donateurs vers l'oxygène moléculaire, on peut admettre que la lumière accroît l'instabilité de sa molécule et augmente ainsi son activité.

Il est important de rappeler à ce sujet que, récemment GARFRON (1926) et HARRIS (1926) ont établi que l'addition au sérum de petites quantités d'hématoporphyrine entraîne l'oxydation des protéines du sérum à la lumière du jour.

Il semble donc que l'étude des actions du rayonnement sur le cytochrome est susceptible de nous conduire à une compréhension plus précise du mécanisme d'action des radiations visibles et ultra-violettes sur le métabolisme des organismes.

Vu : LE DOYEN : Vu : LE PRÉSIDENT :
BALHAZARD. STROHL.

Vu et permis d'imprimer :

LE RECTEUR DE L'ACADÉMIE DE PARIS :
CHARLETY.

BIBLIOGRAPHIE

- ANSON (M.-L.) et MIRSKY (A.-E.). — 1925: On haem in nature. *Journ. of Physiol.*, **60**, 161.
- DEÉRÉ. — 1909: Thèse Faculté des Sciences, Paris.
- GAFFRON (H.). — 1926: Ueber Photooxydationen mittels fluoreszierender stoffe. *Biochem. Zeitschr.*, **179**, 157.
- HARRIS (O. T.). — 1926: Photooxidation of plasma. A note on its sensibilisation. *Biochem. Journ.*, **20**, 280.
- HENRI (V.) et WURMSER (R.). — 1912: Etude quantitative des spectres d'absorption de l'oxyhémoglobine et de l'hémoglobine réduite dans l'ultra-violet. *C. R. Soc. de Biol.*, **72**, 1039.
- 1913: Absorption des rayons ultra-violet et action photochimique. *Journ. de Physique*, **3**, 305.
- HILL (R.) et KEILIN (D.). — 1930: The porphyrin of component of cytochrome and its relationship to other porphyrins. *Proc. Roy. Soc., London*, **B**, **107**, 128.
- KEILIN (D.). — 1925: On cytochrome. A Respiratory Pigment, common to Animals, Yeasts, and Higher Plants. *Proc. Roy. Soc., London*, **B**, **98**, 312.
- 1929: Cytochrome and Respiratory Enzymes. *Proc. Roy. Soc., London*, **B**, **104**, 206.
- 1930: Cytochrome and Intracellular Oxidase. *Proc. Roy. Soc., London*, **B**, **106**, 418.
- MAC MUNN (C. A.). — 1886: Research on Myohaematin and the Histo-haematin. *Phil. Trans. of the Roy. Soc.*, **177**, 267.
- 1887: Further observations on Myohaematin and the Histo-haematin. *Journ. of Physiol.*, **8**, 57.
- 1889: Ueber das Myohämatin. *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, **13**, 497.
- 1890: Ueber das Myohämatin. *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, **14**, 328.
- SHIBATA (K) et TAMIYA (H.). — 1930: Untersuchungen über die Bedeutung des Cytochroms in der Physiologie der Zellatmung. *Acta Phytochimica*, **5**, 23.
- VLÈS (F.). — 1921: Notes sur les constantes optiques des hémoglobines. *Archiv. Phys. Biol.*, **1**, 1.
- WARBURG (O.) et NEGELEIN (E.). — 1929: Ueber das Absorptionsspektrum des Atmungs-ferment. *Biochem. Zeitschr.*, **214**, 64.

TABLE DES MATIERES

	PAGES
INTRODUCTION	1
CHAPITRE PREMIER. — Le cytochrome. Sa caractérisation. Sa répartition et son rôle physiologique.	5
I. — Les hémamines	5
II. — Le cytochrome	6
III. — Complexité du cytochrome	7
IV. — Origine du cytochrome	8
V. — Rôle physiologique du cytochrome	9
CHAPITRE II. — Recherches sur les propriétés spectrales du cytochrome.	11
VI. — Le spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine.	11
VII. — Préparation des extraits de cytochrome.	11
1° Extraction du cytochrome c' de la levure.	11
2° Purification de l'extrait de cytochrome.	12
VIII. — Recherches qualitatives sur l'absorption du cytochrome.	13
IX. — Détermination quantitative de l'absorption.	16
1° Mesures spectro-photométriques	16
2° Mesures spectrographiques	18
CONCLUSIONS.	21
BIBLIOGRAPHIE	23

